

Hollow-Fiber module for 3D-culture

3次元細胞培養用中空糸モジュールセット

(Code:TMHFK-001)

取扱説明書

<ご注意>

本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断への使用はできません。

ご使用前に、本取扱説明書を必ずお読みください。

はじめに

この度は、中空糸モジュールセットをお買い上げいただき誠に有難うございます。本製品を使用し中空糸内に細胞を遠心充填することによって、簡便に3次元培養を行うことができます。

遠心充填培養法は、九州大学・船津教授らにより開発された手法であり、特に肝細胞では、本培養法により組織体形成が誘導され、肝細胞機能を維持したまま長期間の培養ができることが報告されています。

1. 製品内容

- (1)細胞充填用中空糸モジュール・2本（中空糸2本×6束／モジュール、中空糸はオートクレーブで滅菌処理され滅菌蒸留水に浸漬されています。）
- (2)15ml遠心チューブ・2本
- (3)2.5mlシリンジ・3本

2. 製品の受け入れおよび保存

- (1)製品入荷後すみやかに、製品の数量及び輸送による破損や液漏れがないかご確認下さい。異常がある場合には直ちに、東洋紡ライフサイエンス事業部（Tel:06-6348-3786）までご連絡下さい。
- (2)製品を保存する場合は、室温でなるべく温度変化の少ない場所で保存してください。

3. 細胞充填、培養に必要な機器、器具(事前にご用意いただくもの)

- (1) 機器
 - ① クリーンベンチ
 - ② 遠心分離機
 - ③ CO₂インキュベーター
 - ④ 振とう器(CO₂インキュベーター内に設置します)
- (2) 器具または器材
 - ① 滅菌した先細ピンセット 2本
 - ② 滅菌した大きめのピンセット 1本
 - ③ メスまたはメス刃(滅菌) 1本(1枚)
 - ④ 細胞培養用容器(12穴プレート等) 適宜
 - ⑤ 滅菌ピペット 適宜
 - ⑥ 滅菌シャーレ 1枚
 - ⑦ 定規
 - ⑧ その他必要に応じ、マイクロピペット、滅菌チップ等
- (3) 培地(充填した細胞の培養に適した培地)

4. 中空系(細胞充填用中空系モジュール)について

(1) 中空系素材、数量、サイズ

- ・ 中空系素材：セルローストリアセテート
- ・ 中空系内径：285 μm
- ・ 中空系外径：387 μm
- ・ 膜厚：51 μm
- ・ 平均ポアサイズ：0.2 μm
- ・ 中空系数／束数：中空系は2本一組で先端がシリコンボンドで封止されています。この2本組みの束が細胞充填用中空系モジュール1本あたり6束付属しています。

(2) 取扱上の注意点

- ・ 中空系は非常に折れやすいものですので、取扱いには充分注意してください。
- ・ 中空系は常に濡れた状態にし、乾燥させないようにご注意ください。一旦乾燥しますと水分の透過性が悪くなり培養に影響を与えます。
- ・ 中空系は空気(気泡)を通しません。懸濁液を注入する際は気泡が入らないようにご注意ください。

(3) 細胞充填用中空系モジュール

充填用中空系モジュールは下図のような構成になっております。中空系モジュールはチューブキャップに連結した状態になっています。細胞注入口キャップおよびルアーフィッティングは、ネジ式になっており取り外せるようになっています。

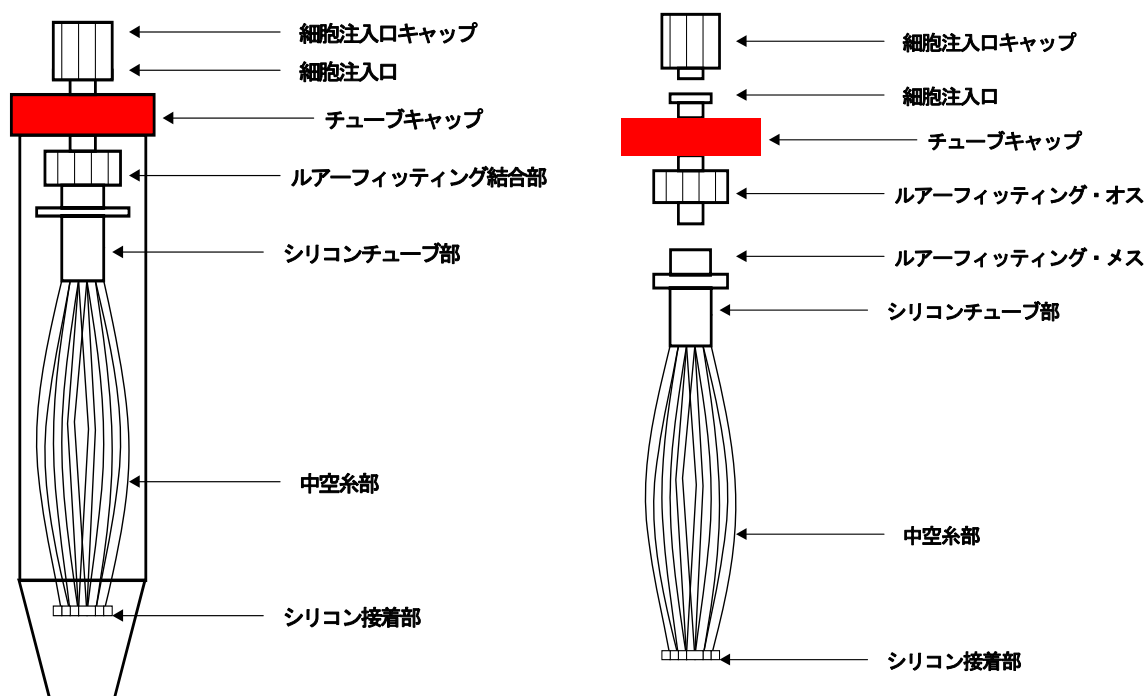
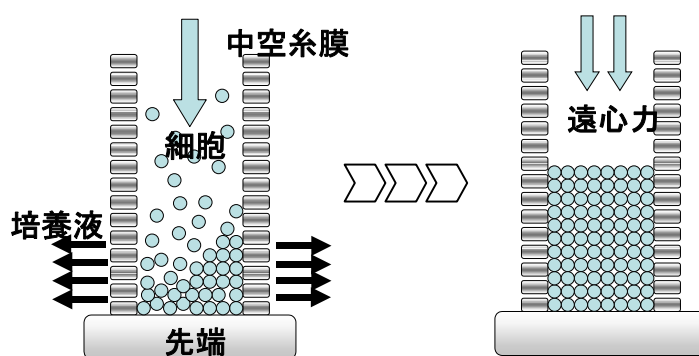
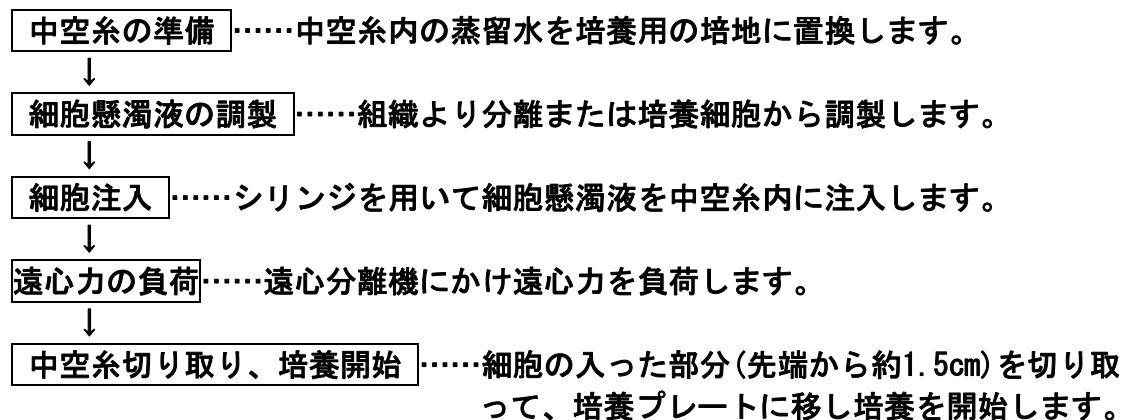


図1. 中空系モジュール構成図

5. 遠心充填培養の流れ



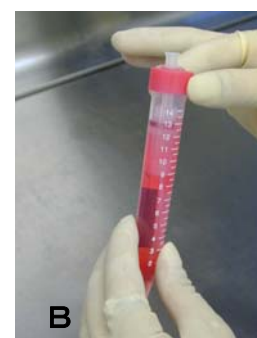
遠心充填のイメージ図

6. 細胞の充填方法

(1) 細胞充填用中空系モジュールの準備

中空系内の蒸留水を充填する細胞に適した培地に置換します。クリーンベンチ内で操作してください。

- ①添付の15ml遠心チューブ、中空系モジュール、注射用シリンジおよび細胞培養用の培地を準備します。
- ②15ml遠心チューブに培地を11ml入れます。
キャップはすぐに外せるようにゆるめておきます。
- ③中空系モジュールの細胞注入口キャップを開けます。
- ④次にチューブキャップをはずし、キャップごと中空系モジュールを抜き出します(写真A)。
- ⑤②で準備した培地入りチューブのキャップを取り、中空系モジュールを培地入りチューブに入れます。このときキャップは締めずにゆるめたままにしておきます(写真B)。
- ⑥細胞注入口にシリンジを差し込み、ゆっくりと内筒をひき、チューブの培地をシリンジ内に吸引します



(写真C)。約3mlの培地を吸引したところでそのままシリンジを注入口から抜きます。

これで中空系内に培地が満たされた状態となります。

- ⑦培地置換後、細胞注入操作まで注入口キャップおよびチューブキャップは閉めておきます。このとき細胞注入口キャップ→チューブキャップの順に締めてください。チューブキャップを先に締めると内圧上昇により培地があふれだすことがあります。



(2) 細胞懸濁液の調製

①準備する細胞数

〈例1〉ヒト肝細胞の場合、1.5cm中空系×2本の内腔に約 3.3×10^5 cellsが充填されます。

充填用チューブには、6束分の細胞を注入しますので、 $6 \times 3.3 \times 10^5$ cells → 2.0×10^6 cells 以上の細胞が必要です。また、充填の際にロスが発生しますので、 2.4×10^6 cells 程度の細胞を準備します。

〈例2〉ラット肝細胞の場合、1.5cm中空系×2本の内腔に約 1.7×10^5 cellsが充填されます。

充填用チューブには、6束分の細胞を注入しますので、 $6 \times 1.7 \times 10^5$ cells → 1.0×10^6 cells 以上の細胞が必要です。また、充填の際にロスが発生しますので、 1.2×10^6 cells 程度の細胞を準備します。

②懸濁液の細胞濃度は、 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml 前後が適しています(細胞の大きさにより異なります)。注入する量が約2.0mlになるように調製します。

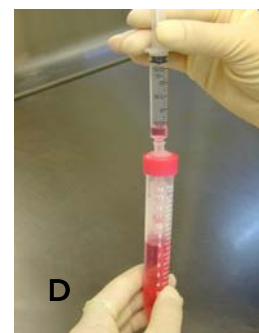
③細胞懸濁液には培養に用いる培地を使用します。

④細胞は充分分散させてください。大きな細胞塊があると目詰まりをおこす場合がありますのでご注意ください。

(3) 細胞の注入

中空系モジュールに用意した細胞懸濁液を注入します。細胞注入の際、中空系内に気泡が入らないよう注意します。また、細胞の注入は一度の操作で必要量を注入します。

- ①(1)で準備した中空系モジュール、細胞懸濁液、2.5ml シリンジを用意する。
- ②チューブキャップをゆるめます。次に中空系モジュールの細胞注入口キャップを外します。
- ③2.5mlシリンジの内筒を、シリンジ目盛りの2.2mlの位置まで引いてからシリンジを細胞注入口にしっかりと差し



込みます。

- ④ゆっくりとシリンジ内筒を限界まで引き、シリンジ内に培地が入ってくるのを確認します(写真D)。細胞をすぐに注入しない場合は、内筒はいっぱいに引いたところまでいったん止めておきます。

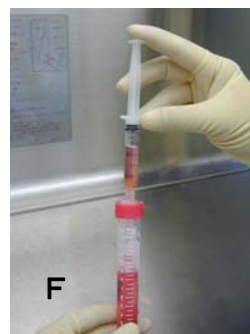
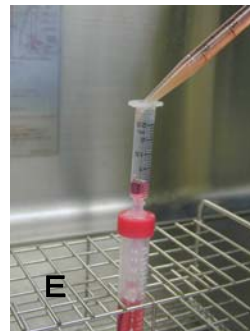
- ⑤細胞をピペティングして充分懸濁したら、シリンジ内筒を抜き取ります。シリンジに入ってきた培地は徐々に下のチューブに戻っていきます。このシリンジ内の培地がなくなる前に手早く細胞懸濁液(2.0ml)をシリンジ内に入れます(写真E)。

シリンジ内に培地がない状態で細胞懸濁液を入れますと中空系内に空気が入ってしまいます。空気が入りますと詰まりの原因となりますのでご注意ください。シリンジ内の培地がなくなった場合は、シリンジを一旦外し、③の操作からやり直してください。

- ⑥すぐにシリンジ内筒を差込み、内筒を一定の速度(0.2ml/秒程度)でゆっくりと押し下げて細胞懸濁液を注入します(写真F)。(注入速度が速いほど細胞への物理的ダメージが大きくなります。)

中空系モジュールのシリコンチューブの部分(図1. 中空系モジュール構成図を参照)にシリンジ内の空気が送られてきたところで注入を止めます。

- ⑦細胞注入口のキャップをしっかりと閉め、次にチューブキャップを閉めます(写真G)。逆の順に閉めると、注入口からチューブ内の圧が抜けるため培地が逆流しますのでご注意ください。



(4) 遠心

中空系内の細胞に遠心力を負荷します。

- ①中空系モジュールを遠心機にかけます。(例えば肝細胞の場合では60G、90秒の遠心をします。細胞の種類により至適条件は異なりますのでご注意ください。)

(5) 中空系の切り取り

細胞が充填された部分の中空系を一定の長さに切り取り培養用プレートに移します。

- ①12 ウェル培養プレートを用意し、0.8ml/ウェルずつ培地を入れます。また、φ10cm 程度の滅菌シャーレを用意し、培地を約20ml 入れておきます。
- ②遠心の終わった中空系モジュールをクリーンベンチ内の試験管スタンドに立て、チューブキャップをゆるめます。
- ③チューブキャップを左手で持ち、中空系モジュールを持ち



上げます。

- ④右手にもったピンセット(大きめのもの)でモジュールのシリコンチューブ部をしっかりとはさみ、左手のキャップをひねって(反時計回り)、中空糸部分を外します。

(写真H、I)

- ⑤外した中空糸部を培地を入れておいたシャーレに入れます(写真J)。

シャーレの下に目盛りが見えるように定規を置き、中空糸下端から1.5cm(シリコンボンドののりしろを除く正味の長さ)の位置を、先細ピンセットで中空糸を圧着するような感じで強くはさみます。(中空糸下端を左に向け、ピンセットを左手で持ちます。)

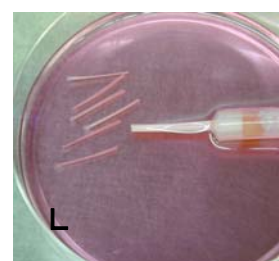
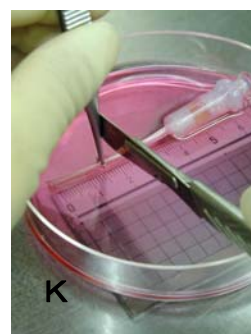
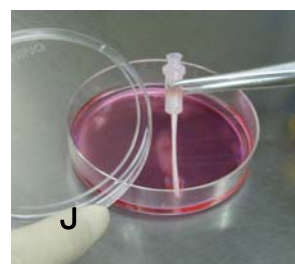
- ⑥先細ピンセットで中空糸をつかんだまま、ピンセットに沿わせるように刃をあて、すぐ右側をメスで切ります。

(写真K、L)。

- ⑦先細ピンセットを使って、切り離した中空糸束を12ウェルプレートに移していきます(写真M、N)。

ピンセットでつかむときは細胞が入っていない中空糸の端をつかむようにします。

また、シリコン接着部どうしはくっつきやすくなっています。もしくっついている場合は、先細ピンセットを2本使って引き離します。無理にひっぱるとちぎれる場合があります。どうしても離れない場合は、メスで切り離してください。



12well プレートに移した中空糸バンドル

7. 培養

CO₂インキュベーターに入れて培養します。振とう培養が必要ですので、CO₂インキュベーター内に振とう機を設置する必要があります。

- (1) 中空糸バンドルを入れた12ウェルプレートにCO₂インキュベーターの振とう機上にのせ培養を開始します。振とうにより、培地がゆっくりと確実に攪拌されるようにします。

振とう機は、水平旋回タイプ、傾斜旋回タイプのものなどがご使用できます。



傾斜旋回タイプ



水平旋回タイプ

- (2) 培地交換

培地交換の際は、アスピレーターか1000 μ lマイクロピペットを使って培地を吸引除去し、あらかじめ温めておいた新しい培地を入れます。吸引力の強いアスピレーターを使用すると誤って中空糸バンドルを吸引してしまう恐れがあります。アスピレーター先端に(～200 μ l用の)イエローチップ等を装着することをお勧めします。



8. 廃棄

実験終了後は、必ずオートクレーブなどの滅菌処理をしてから廃棄してください。

- ・ 本製品の使用は研究用に限定されています。ヒトまたは動物への適用及び臨床診断への使用はできません。
- ・ 本製品の使用によって生じたいかなる事故あるいは損害についても弊社では責任を負いかねます。ご了承の上ご使用下さい。

9. 参考文献

Funatsu K, Iijima H, Nakazawa K, Yamashita Y, Shimada M, Sugimachi K.
Hybrid Artificial Liver Using Hepatocyte Organoid Culture.
Artificial Organs, 25(3), 194-200, 2001



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>